PARTS OF THE ORIGINAL DOCUMENT

ARE OF POOR REPRODUCTIVE QUALITY

CERTAINES PARTIES DU DOCUMENT ORIGINAL

SONT DE PIÈTRE QUALITÉ DE REPRODUCTION

Surveillance des pulvérisations aériennes d'insecticides contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec, en 1984

Contrôle de qualité effectué sur les préparations à base de *Bacillus thuringiensis* utilisées en 1984

par

Jean Cabana, microbiologiste

avec l'assistance de

Monique Dubé, tech. Chi.Bio.

Service d'entomologie
et de pathologie

Dr Jean-Guy Davidson, ing. for.
chef de service

Division Environnement
et sécurité

Gilles Gaboury, biol.
responsable de division

Juin 1985

Surveillance des pulvérisations aériennes d'insecticides contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec, en 1984

Contrôle de qualité effectué sur les préparations à base de *Bacillus thuringiensis* utilisées en 1984

par

Jean Cabana, microbiologiste

avec l'assistance de

Monique Dubé, tech. Chi.Bio.

Service d'entomologie
et de pathologie

Dr Jean-Guy Davidson, ing. for.
chef de service

Division Environnement
et sécurité

Gilles Gaboury, biol.
responsable de division

Juin 1985

TABLE DES MATIÈRES

Page

INTRODUCTION..... 1

1. PRODUITS UTILISÉS..... 2

2. PLAN ET MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE..... 2

2.1 Plan d'échantillonnage..... 2

2.2 Méthode d'échantillonnage..... 2

2.3 Échantillonnage des concentrés..... 5

2.4 Échantillonnage effectué avant le départ des avions..... 5

3. TESTS EFFECTUÉS SUR LES ÉCHANTILLONS..... 6

3.1 Le pH..... 6

3.2 Recherche de pathogènes..... 7

3.3 Identification de l'espèce bactérienne insecticide..... 9

3.3.1 La morphologie..... 11

3.3.2 La biochimie..... 11

3.3.3 La sérologie..... 13

3.4 La recherche de bactériophages..... 13

3.5 Le potentiel insecticide..... 14

3.6 L'exotoxine-Bêta..... 16

CONCLUSION..... 16

RECOMMANDATIONS..... 17

ANNEXE 1..... 18

ANNEXE 2..... 19

ANNEXE 3..... 20

TABLE DES MATIÈRES (suite)

Page

ANNEXE 4..... 22

ANNEXE 5..... 23

ANNEXE 6..... 24

ANNEXE 7..... 26

INTRODUCTION

Dans le cadre de son 15e programme de pulvérisations aériennes d'insecticides pour lutter contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette, le ministère de l'Énergie et des Ressources entreprenait, en 1984, de traiter 327 000 hectares à l'aide de préparations à base de *Bacillus thuringiensis* (B.t.).

Une telle innovation en matière d'utilisation massive de B.t. posait le problème du contrôle de la qualité des préparations utilisées.

Les années précédentes, l'insecticide biologique était employé à des fins expérimentales ou sur de petites surfaces (45 000 hectares en 1983 au Québec) et le contrôle de qualité effectué par les utilisateurs, en Amérique du Nord ou en Europe, était peu élaboré, voire même inexistant.

Il faut, cependant, rappeler que les compagnies productrices font un contrôle de qualité en usine, se conformant à une directive émise par l'Environmental Protection Agency des États-Unis (U.S.E.P.A.) et portant le numéro 40 FR 180.1011, dont une copie se trouve à l'annexe 1. La lecture de ce document permet de constater que les exigences de qualité concernent l'identification du bacille, la contamination du produit, la présence de pathogènes et celle de l'exotoxine-Bêta.

Un contrôle de qualité devrait contenir au moins ces aspects auxquels il faudrait ajouter la vérification du potentiel insecticide du produit.

En 1984, nous avons mis sur pied un premier contrôle de qualité en tentant, dans la mesure de nos possibilités, de respecter ces données de base.

.../2

1. LES PRODUITS UTILISÉS

Voici la liste des produits utilisés en 1984 à des fins opérationnelles (O) ou expérimentales (E).

Dipel 88 (O)	Thuricide 32 LV (O)
Dipel 132 (E)	Thuricide 48 LV (O) et (E)
Dipel 176 (E)	Thuricide 64 B (E)
Futura (O)	San 415 (E)

Le tableau 1 nous indique les numéros de lots reçus par produit utilisé.

2. PLAN ET MÉTHODE D'ÉCHANTILLONNAGE

2.1 Plan d'échantillonnage

En 1984, nous avons utilisé un plan d'échantillonnage qui reposait sur la quantité de barils contenus dans chaque lot.

Le tableau 2 nous montre le plan suivi.

2.2 Méthode d'échantillonnage

Afin de faciliter le brassage mécanique des barils avant la prise d'échantillons, un prototype d'appareil fut utilisé. Cet appareil, conçu par du personnel de notre Service, s'avéra d'une aide inestimable dans cette phase particulièrement "lourde" de l'échantillonnage.

.../3

Tableau 1 - Numéros des lots livrés pour l'opération de pulvérisation 1984

Produit	Numéro de lots
Dipel 88	40049 BJ
"	40050 BJ
"	41060 BJ
"	43115 BJ
"	45134 BJ
"	45135 BJ
"	45140 BJ
"	45143 BJ
Dipel 132	64-366 BJ
"	64-367 BJ
Dipel 176	65-387 BJ
Futura (1983)	1040783
Futura (1983)	1033083
Futura (1984)	S 1746
"	S 1747
"	S 1749
"	S 1750
"	S 1751
"	S 1752
"	S 1753
"	S 1754
"	S 1755
"	S 1756
"	S 1757
"	S 1758
"	S 1759
Thuricide 32 LV	41091
"	41101
"	41111
"	41121
"	41131
"	41141
"	41151
"	41161
"	41171
Thuricide 48 LV	41181
"	41191
"	41221
"	41231
"	41241
"	41251
"	41261
"	41271
"	41281
"	41291
"	41301
"	41311
"	41321
"	41331
"	41351
"	41451
"	T15 - 1170
"	T15 - 1176
"	T15 - 1180
"	T15 - 1190
"	T15 - 1191
"	T15 - 1192
"	T15 - 1194
"	T16 - 1171
"	T16 - 1175
"	T16 - 1177
"	T16 - 1185
"	T16 - 1189
"	T16 - 1193
"	T16 - 1195
Thuricide 64 B	41322
San 415	41302

.../4

Tableau 2 - Plan d'échantillonnage

Nombre de barils par lot	Quantité de barils pour échantillonnage
1 - 30	4
31 - 60	6
61 - 90	8
91 - 120	10

Essentiellement, cet appareil fait rouler le baril sur lui-même, à raison de 40 tours/minute. La durée normale du brassage est de trois minutes. Après cette opération, le baril est remis en position verticale, ouvert, et on procède au prélèvement de l'échantillon.

À l'aide d'une pipette stérile de 10 ml et d'un remplisseur Pi-Pump*, on retire du baril une quantité de 50 à 60 ml qui est déposée dans un petit flacon ambré stérile préalablement étiqueté. Après l'échantillonnage, les flacons sont apportés au laboratoire. Une quantité de 15 ml de chaque échantillon est transférée dans une éprouvette stérile à bouchon vissé, et placée dans un congélateur pour analyse future de la potentialité insecticide. Le reste de l'échantillon est conservé à 4°C.

* Marque déposée de Bel-Art Products.

.../5

2.3 Échantillonnage des concentrés

Le tableau 3 nous révèle la quantité d'échantillons de concentré prélevés par type de produit reçu, chaque lot livré ayant été échantillonné.

2.4 Échantillonnage effectué avant le départ des avions

Des échantillons (un par voyage) ont été prélevés avant le départ des avions vers les lieux de pulvérisation. Ce prélèvement se faisait directement au niveau de la pompe qui servait à remplir les réservoirs de l'avion. Le tableau 4 nous indique la quantité d'échantillons prélevés selon le type de concentré ou de mélange utilisé.

Tableau 3 - Nombre d'échantillons prélevés par produit concentré

Produit	Nombre de barils livrés	Nombre de lots	Nombre de barils échantillonnés
Dipel 88 (1983)	43	8	11
Dipel 132	120	2	14
Dipel 176	44	1	6
Futura (1983)	5	2	2
Futura (1984)	76	13	23
Thur. 32 LV	754	9	81
Thur. 48 LV	1 633	30	171
Thur. 64 B	4	1	1
San 415	7	1	3

.../6

Tableau 4 - Nombre d'échantillons prélevés lors du chargement des avions

Produit	concentré	dilué*	Nombre d'échantillons prélevés
Dipel 88		40 - 60	3
Dipel 132	X		5
Dipel 176	X		1
Futura		60 - 40	3
Thur. 32 LV		50 - 20 - 30**	100
Thur. 48 LV	X		73
Thur. 64 B	X		2
San 415	X		3

* Le premier chiffre de la dilution indique la quantité d'insecticide utilisée, le second se référant à celle de l'eau.

** Pour le Thuricide 32 LV, les proportions représentent, dans l'ordre, celles de l'insecticide, du Sorbitol et de l'eau.

3. TESTS EFFECTUÉS SUR LES ÉCHANTILLONS ET RÉSULTATS OBTENUS

3.1 Le pH

Le pH de chacun des échantillons de concentré a été relevé.

Le tableau 5 nous révèle les valeurs de pH moyen obtenues parmi les diverses préparations.

Les résultats indiquent que les produits de type Thuricide sont plus acides que ceux des autres compagnies. Ce qui pourrait apporter une certaine explication aux problèmes de corrosion rencontrés cette année, au niveau de certaines composantes des systèmes de chargements et de ceux des avions.

.../7

Tableau 5 - Valeurs du pH des diverses préparations

Produit	pH moyen	Étendue
Dipel 88	4,94	4,16 - 5,58
Dipel 132	5,35	5,05 - 6,00
Dipel 176	5,11	5,07 - 5,20
Futura	5,30	5,03 - 5,54
Thuricide 32 LV	4,12	3,70 - 4,54
Thuricide 48 LV	4,78	4,10 - 5,22
Thuricide 64 B	4,23	N.A.*
San 415	4,25	4,16 - 4,39

* N.A.: Un seul lot a été reçu dans le cas de ce produit.

3.2 Recherche de pathogènes

La recherche de micro-organismes particuliers dans un échantillon donné requiert l'utilisation de milieux de cultures d'isolation. Pour les pathogènes, la gélose au sang et celle de Mac Conkey sont habituellement utilisées[1].

Pour notre étude, nous avons utilisé ces deux milieux auxquels fut ajoutée la gélose nutritive. Les échantillons de concentrés furent ensemencés sur ces trois milieux et incubés à 37°C en aérobiose. Après 18 heures d'incubation, on observa une croissance sur la gélose nutritive et sur celle au sang, mais aucune sur celle de Mac Conkey.

Les colonies apparues sur les deux types de gélose semblent toutes identiques et elles ont l'aspect suivant: colonies plates, rugueuses, de couleur crème avec hémolyse-alpha sur la gélose au sang.

---

1) LENNETTE E.H., A. Balows, W.J. Hausler, Jr. and J.P. Truant. Manual of clinical microbiology, third Edition, 1980, Washington, D.C., pp. 75 et 198.

.../8

Des prélèvements de diverses colonies sont effectués pour observation microscopique, et les milieux sont remis à l'incubation pour une période de trois jours. Une observation journalière est effectuée, afin de tenter de découvrir la présence de colonies différentes de celles déjà observées le premier jour.

L'examen microscopique des prélèvements effectués après 18 heures révèle que les colonies sont toutes constituées de bâtonnets mobiles présentant une spore subterminale. Ils sont Gram positif.

Toutes les colonies examinées après cette période d'incubation ont présenté le même type de bactérie. Ceci confirme qu'il s'agit de représentants du genre *Bacillus*.

Des géloses au sang ont aussi été incubées durant 24 heures dans une jarre anaérobie. Aucune croissance ne fut observée. Ceci signifie qu'il n'y avait pas d'organismes anaérobies dans ces préparations.

Cette recherche fut effectuée sur tous les échantillons recueillis lors de l'échantillonnage et, dans tous les cas, les résultats ont été identiques.

De plus, une série de 52 échantillons de concentrés non identifiés, provenant des diverses préparations, fut envoyée au laboratoire BIO-DIAGNOSTICS C.B.M. INC. de Montréal (Annexe 2). Malgré leurs efforts, ils ne purent mettre en évidence la présence de contaminants pathogènes (Annexe 3).

À la suite de cette recherche, nous pouvons affirmer que les préparations utilisées en 1984 ne contenaient pas de pathogènes.

.../9

3.3 Identification du micro-organisme présent

Depuis sa première identification en 1901 par Ishiwata au Japon[2], et sa redécouverte européenne en 1911 par Berliner en Allemagne[3], le *Bacillus thuringiensis* a été utilisé pour la fabrication de diverses préparations insecticides.

L'espèce appelée *Bacillus thuringiensis* se caractérise par la présence, durant la sporulation, d'une protéine cristalline (le cristal) renfermant l'endotoxine-delta, responsable, en majeure partie si non en totalité, de l'action insecticide de cette bactérie pour certains insectes[4].

Cette espèce est elle-même subdivisée en variétés selon une classification chiffrée reposant sur la présence d'antigènes flagellaires (sérotypes-H) (tableau 6).

---

2) ISHIWATA, S. (1901). Dainihon Sanshi Kaiho No. 114, pp. 1-5.

3) BERLINER, E. (1911). Z. Ges. Getreidewes. 3: 63-70.

4) BERGEY'S Manual of Determinative bacteriology, 8th Edition. Buchanan R.E. & Gibbons N.E. co-editors, 1974, Williams & Wilkins Company, Baltimore.

.../10

Tableau 6 - Sérotypes et variétés du *Bacillus thuringiensis*

Espèce	Sérotype-H	Variété
Bacillus thuringiensis	1	*thuringiensis*
"	2	*finitimus*
"	3a	*alesti*
"	3a 3b	*kurstaki*
"	4a 4b	*sotto*
"	4a 4b	*dendrolimus*
"	4a 4c	*kenyae*
"	5a 5b	*galleriae*
"	5a 5c	*canadensis*
"	6	*entomocidus*
"	6	*subtoxicus*
"	7	*aizawai*
"	8a 8b	*morrisoni*
"	8a 8c	*ostriniae*
"	9	*tolworthi*
"	10	*darmstadiensis*
"	11a 11b	*toumanoffi*
"	11a 11c	*kyushuensis*
"	12	*thompsoni*
"	13	*pakistani*
"	14	*israelensis*
"	15	*indiana*
"	16	*dakota*
"	17	*tohokuensis*
"	18	*kumanotoensis*
"	19	*tochigiensis*
"	20	*colmeri*
"	-	*wuhanesis* *

* Cette variété qui n'a pas de ciliation ne peut être classée par la méthode de l'agglutination flagellaire. Elle n'a donc pas de sérotype.

Parmi les différentes variétés, plusieurs ont été utilisées dans des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* (*thuringiensis*, *galleriae*, *alesti* surtout). La variété kurstaki est celle qui est employée maintenant en Amérique du Nord et en Europe de l'ouest dans la lutte contre les lépidoptères nuisibles.

Toutes les préparations à base de B.t. pour usage forestier, homologuées au Canada, contiennent, comme agent actif, du *Bacillus thuringiensis* variété kurstaki (sérotype 3a, 3b).

.../11

3.3.1 La morphologie

Tous les échantillons de produits ont été ensemencés sur gélose nutritive pour fins d'identification.

Après 24 heures d'incubation à 29°C, les colonies apparues ont un aspect rugueux; elles sont plates, à contour irrégulier, opaques et blanchâtres.

Une microscopie de ces cultures révèle qu'il s'agit de bâtonnets mobiles, isolés ou en chaînes, de 3 à 5 microns de longueur et de 1 à 1,5 microns de largeur. On observe la présence d'endospores ovales, subterminales et non déformantes. Elles ont de 0,8 à 0,9 microns par 1,6 à 2 microns. Des cristaux accompagnent ces spores et leur dimension est, en moyenne, de 0,4 à 0,8 par 1 à 1,4 micron.

Une coloration de Gram effectuée sur ces cellules révèle qu'elles sont de type Gram positif.

L'incubation est prolongée jusqu'à 50 heures. Après cette période, on remarque que les cellules sont toutes lysées. Le milieu renferme des spores et des cristaux dont la présence est révélée par la coloration de Smirnoff[5].

Les résultats de l'étude morphologique nous indiquent que nous sommes en présence de l'espèce *Bacillus thuringiensis*.

3.3.2 La biochimie

Madame H. de Barjac[6] a publié une clé de détermination biochimique des *Bacillus thuringiensis* (Annexe 4). Basée sur ce travail, une série de tests a été réalisée sur des souches provenant des divers produits.

---

5) SMIRNOFF, W.A. J. Insect. Pathol. 4, 1962, pp 384-386.

6) BARJAC, H. de. (1981). Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis* in Microbial Control of pests and plant Diseases (1970-1980), Burges, H.D., ed. Academic Press, London and Toronto, pp. 35-43.

Le tableau 7 indique les résultats obtenus sur des échantillons de chacun des produits. Il est facile d'y constater, en se référant à la clé de détermination (Annexe 4), que toutes les souches appartiennent à la variété kurstaki.

Tableau 7 - Caractères biochimiques des souches de B.t. étudiées

Test / Concentrés[a]	Dipel 88 (2)	Dipel 132 (2)	Dipel 176 (1)	Futura (3)	Thu. 32 LV (5)	Thu. 48 LV (10)	Thu. 64 B (1)	San 415 (1)
A.M.C.[b]	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecithinase	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteolyse	++	++	++	++	++	++	++	++
A.D.H.[c]	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	++	++	++	++	++	++	++	++
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-
Voile	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitine	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+
T.W. estérase[d]	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

a) Les chiffres entre parenthèses renvoient à la quantité de lots de chaque produit soumis à ces tests.

b) A.M.C.: Acetyl-methyl-carbinol.

c) A.D.H.: Arginine-dehydrolase.

d) Tween-Estérase: ce test n'a pas été réalisé par notre laboratoire.

.../13

3.3.3 La sérologie

Pour distinguer, de façon certaine, entre les diverses variétés de B.t., il faut non seulement en étudier les caractères biochimiques, mais aussi en déterminer le sérotype.

La méthode sérologique mise au point par de Barjac[7] et utilisée par notre laboratoire repose sur l'agglutination flagellaire (antigène -H).

Les antisérums (anti-3a, 3b) ont été fournis par le Dr H. Dulmage (U.S.D.A. Brownsville, Texas) et par le Dr T.R. Shieh (Zoecon Inc., Wasco, Ca.).

Dans tous les cas, l'agglutination fut totale au titre de 51 200. Ceci confirme que toutes les souches appartiennent au groupe dont le sérotype H est le 3a, 3b.

3.4 La recherche de bactériophages

L'apparition de plages lors de certains ensemencements de concentrés nous a conduits à soupçonner la présence de bactériophages dans certains produits.

Pour fins de recherche et de confirmation, une série de 25 échantillons provenant de tous les produits utilisés en 1984, fut envoyée au Dr H.W. Ackerman du Département de microbiologie de la Faculté de médecine de l'Université Laval (Annexe 5).

Les résultats obtenus, dont une copie se trouve à l'annexe 6, permettent de constater que des phages se retrouvaient dans des échantillons de chacun des produits utilisés en 1984.

---

7) BARJAC, H. de et A. Bonnefoi. Entomophaga, 1962, pp. 5-31.

.../14

Cette situation n'a rien d'étonnant; elle est plutôt la règle pour divers produits fabriqués à l'aide de bactéries[8]. C'est ainsi que des phages ont été retrouvés dans le lait, le yogourt, le vin, la viande, etc. On les rencontre aussi dans l'industrie des antibiotiques bactériens, dans les fermentations utilisant des bactéries, etc.

Cette présence ne constitue, en aucune façon, un danger pour la santé humaine, car les phages ne peuvent se multiplier dans les cellules humaines.

Pour les préparations à base de B.t., leur présence durant la fermentation conduira à une diminution marquée de l'activité insecticide. Ce problème a déjà été soulevé par divers auteurs[9] et il constitue une réalité menaçante pour les producteurs de B.t. qui essaient d'utiliser des souches résistantes aux phages ou porteuses de phages tempérés. Enfin, il est important de noter que la présence de phages dans la préparation finale de B.t. (spore - cristal) n'altère en rien la potentialité insecticide, car le phage ne s'attaque qu'à la cellule végétative de la bactérie.

3.5 Le potentiel insecticide

L'évaluation de la potentialité insecticide est de première importance pour tout utilisateur de produits insecticides.

En ce qui concerne les préparations à base de B.t., cette estimation se fait à l'aide de bio-tests réalisés dans des conditions bien définies[10].

---

8) ACKERMAN, H.W. Lettre du 15 octobre 1984 dont une copie se trouve à l'annexe 7.

9) ACKERMANN, H.W. et W.A. Smirnoff. Can. J. Microbiol., 24, 818, 1978.
MITEVA, V.I. C.R. Acad. Bulg. Sc., 31, 913, 1978.
ZAMOLA B., A. Saric, G. Karminski-Zamola et G. Idor C. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 17, 1983, pp. 103-106.

10) DULMAGE, H.T., O.P. Boening, C.S. Rehnborg and G.D. Hansen. J. invertebr. Pathol. 18: 240-245, 1971.

.../15

Nous n'avons pu, nous-mêmes, réaliser en 1984 ces tests, mais afin d'en avoir un aperçu, nous avons envoyé des échantillons sans identification précise de Thuricide 48 LV à un laboratoire indépendant aux États-Unis. Ce produit titre (selon l'étiquette) à 48 M.U.I. par gallon américain.

Le tableau 8 nous indique les résultats obtenus.

Tableau 8 - Valeurs de la potentialité insecticide

Numéro de l'échantillon	No du lot	Potentialité en M.U.I.*/gallon U.S.
1	41191	60
2	41221	38
3	41241	39
4	41261	42,4
5	41331	47,2

* M.U.I.: Milliard d'unités internationales.

Pour ces tests, il est admis une variation de ± 20%[11].

Dans ce cas-ci, comme le produit titre à 48 M.U.I. par gallon U.S., ceci signifie une étendue maximale de 38 à 58 M.U.I.

Les résultats du tableau indiquent que les échantillons analysés ont tous répondu à ce critère, ce qui signifie que leur potentialité est conforme à l'étiquette du fabricant.

---

11) BEEGLE, C., H. Dulmage and Al. in Preliminary report on standardization of Lepidopterous *Bacillus thuringiensis* Bioassays, item 4b, p. 2, sept. 22, 1982. U.S.D.A. Brownsville, Texas. Unpublished report.

.../16

3.6 L'exotoxine-Bêta

Aucun test n'a été réalisé, cette année, pour confirmer l'absence de cette toxine.

Les compagnies, selon la directive de l'E.P.A. (Annexe 1), réalisent un bio-test en utilisant comme insecte-cible la mouche domestique (*Musca domestica*)[12].

Comme notre étude a démontré que les divers produits utilisés sont de la variété kurstaki et que celle-ci est reconnue comme ne fabriquant pas cette toxine[13], on peut conclure que ces produits n'en contenaient pas.

CONCLUSION

Ce premier contrôle de qualité nous révèle que:

1) Les préparations à base de B.t. utilisées en 1984 ne semblaient pas contenir de contaminants pathogènes.

2) Le *Bacillus thuringiensis* utilisé était bien de la variété kurstaki.

3) Des bactériophages se retrouvaient dans tous les types de préparations.

4) La potentialité de quelques échantillons de 48 LV se comparait à la valeur annoncée sur l'étiquette.

---

12) MECHALAS, BJ, O. Beyer (1963). Production and assay of extracellular toxins by *Bacillus thuringiensis*. Div. Ind. Microbiol., 4: 142-147.

13) SEBESTA, K. J. Farkas and K. Horska (1981). Thuringiensin, the Beta-exotoxin of *Bacillus thuringiensis* in Microbial Control of Pests and plant Diseases (1970-1980). Burges, H.D., ed.). Academic Press, London and Toronto, p. 250.

.../17

RECOMMANDATIONS

1) Pour échantillonner les barils, il serait préférable d'utiliser des tubes de verre stériles au lieu des pipettes stériles de 10 ml. Ceci permettrait de prélever à des profondeurs plus grandes et d'obtenir un échantillon composite reflétant mieux le contenu du baril.

2) Dans l'avenir, il nous semble inutile de continuer à faire la recherche de bactériophages, car il semble certain que nous en retrouverons.

Cependant, l'utilisation de phages pourrait être envisagée pour mettre sur pied un système de lysotypie apte à aider à l'identification des souches de B.t.

3) L'envoi d'échantillons à des laboratoires indépendants devra se poursuivre, afin de permettre une confirmation de nos résultats.

.../18

§ 180.1011 Viable spores of the microorganism *Bacillus thuringiensis* Berliner; exemption from the requirement of a tolerance.

(a) For the purposes of this section the microbial insecticide for which exemption from the requirement of a tolerance is being established shall have the following specifications.

(1) The microorganism shall be an authentic strain of *Bacillus thuringiensis* Berliner conforming to the morphological and biochemical characteristics of *Bacillus thuringiensis* as described in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eighth Edition.

(2) Spore preparations of *Bacillus thuringiensis* Berliner shall be produced by pure culture fermentation procedures with adequate control measures during production to detect any changes from the characteristics of the parent strain or contamination by other microorganisms.

(3) Each lot of spore preparation, prior to the addition of other materials, shall be tested by subcutaneous injection of at least 1 million spores into each of five laboratory test mice weighing 17 grams to 23 grams. Such test shall show no evidence of infection or injury in the test animals when observed for 7 days following injection.

(4) Spore preparations shall be free of the *Bacillus thuringiensis* β-exotoxin when tested with the fly larvae toxicity test ("Microbial Control of Insects and Mites," R P M Bond et al., p. 380 ff., 1971). This specification can be satisfied either by determining that each master seed lot brought into production is a *Bacillus thuringiensis* strain which does not produce β-exotoxin under standard manufacturing conditions or by periodically determining that β-exotoxin synthesized during spore production is eliminated by the subsequent spore harvesting procedure.

(b) Exemption from the requirement of a tolerance is established for residues of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis* Berliner as specified in paragraph (a) of this section, in or on beeswax and honey and all other raw agricultural commodities when it is applied either to growing crops or when it is applied after harvest in accordance with good agricultural practices.

(Sec. 408(d)(2), 68 Stat. 512, (21 U.S.C. 346a(e)))

[36 FR 22540, Nov. 25, 1971, as amended at 38 FR 19045, July 17, 1973; 42 FR 28540, June 3, 1977; 45 FR 43721, June 30, 1980; 45 FR 56347, Aug. 25, 1980]

§ 180.1012 1,1,1-Trichloroethane; exemption from the requirement of a tolerance.

The fungicide, 1,1,1-trichloroethane is exempted from the requirement of a tolerance for residues when used in the postharvest fumigation of citrus fruits.

§ 180.1013 Sulfur dioxide from use in fumigants for stored grains; exemption from the requirement of a tolerance.

(a) Residues from the use of sulfur dioxide in liquid grain-fumigant formulations for marker or fire-retardant purposes at levels not exceeding 5 percent by weight of such formulations are exempted from the requirement of a tolerance in or on barley, buckwheat, corn, oats, popcorn, rice, rye, grain sorghum (milo), wheat.

(b) Residues of sulfur dioxide resulting from postharvest fungicidal use are exempted from the requirement of tolerances in or on corn for feed use only.

[36 FR 22540, Nov. 25, 1971, as amended at 45 FR 41419, June 19, 1980]

§ 180.1014 Pentane; exemption from the requirement of a tolerance.

Pentane is exempted from the requirement of a tolerance for residues when used in accordance with good commercial practice as an adjuvant in liquid grain fumigants for the fumigation of the following grains: Barley, corn, oats, popcorn, rice, rye, sorghum (milo), wheat.

§ 180.1015 Sodium propionate; exemption from the requirement of a tolerance.

Sodium propionate is exempted from the requirement of a tolerance for residues when used as follows:

(a) As a fungicide in the production of gelatin.

(b) For postharvest application as a preservative on salad greens and vege-

Référence: U.S. E.P.A. Code of Federal Registrations No 40, Subpart D - Exemptions from tolerances section 180.1011, p. 299, July 1983.

Liste des échantillons envoyés à Bio-Diagnostics C.B.M.

Numéro des échantillons	Numéro du lot	Produit
1	41101	Thuricide 32 LV
3	41091	"
4	41101	"
5	41131	"
6	41121	"
7	41161	"
8	41171	"
9	41151	"
10	41141	"
12	41111	"
13	41191	Thuricide 48 LV
14	41241	"
15	41321	"
16	41221	"
17	41301	"
18	41241	"
20	41281	"
21	41291	"
23	41251	"
24	41301	"
25	1176	"
26	41311	"
27	41261	"
28	41351	"
29	T-16-1185	"
30	T-16-1189	"
31	T-16-1171	"
32	T-16-1177	"
33	T-15-1180	"
34	T-16-1175	"
35	T-15-1191	"
36	41451	"
37	T-15-1192	"
38	T-16-1193	"
39	41331	"
40	T-15-1190	"
41	T-16-1195	Thuricide 48 LV
42	T-15-1194	"
43	41351	"
44	T-15-1170	"
45	41291	"
46	41261	"
47	64-366-BJ	Dipel 132
48	64-367-BJ	"
49	65-387-BJ	Dipel 176
50	41322	Thuricide 64 B
51	41302	San 415
52	S-1747 (84F16)	Futura
53	S-1758 (84F16)	"
54	S-1749 (84F8)	"
57	45-135-BJ	Dipel 88
58	45-140-BJ	"

.../20

Annexe 3

LABORATOIRES
BIO-DIAGNOSTIC C.B.M. INC.

175, chemin Stillview
Suite 160
Pointe-Claire, QC
H9R 4S3
Tél.: (514) 694-1072

LABORATOIRE DE CONTROLE DE QUALITE
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

CERTIFICAT D'ANALYSE

CLIENT: Monsieur Jean Cabana
Ministère Energie et Ressources
575, chemin Fraserville
Rivière-du-Loup, QC
G5R 3Y5

ANALYSE: 1624

NOMBRE D'ECHANTILLONS ANALYSES: 52

PRODUIT: Milieu biologique (pesticides)

MEDIUM: # de lots: N/A. Numérotation: 01 à 58 sauf les 02, 11, 19, 22, 55,56
Date de numérotation: Juillet 05

TEST: Identification bactérienne, recherche de contaminants pathogènes

RESULTAT: Bacillus THURINGIENSIS, contaminant commun à tous les médium

METHODE: Bergey's
Mac Faddin

REMARQUES: Nous n'avons pu démontrer aucun contaminant qui pourrait s'avérer pathogène.

RECU LE: 06-07-84

DATE DU RAPPORT: 13-08-84

APPROUVE PAR: Gaétan Bellemare, B.Sc.

.../21

1) Dénombrement bactéries totales

- TNIX10^{-9} bactéries/mL, pour chaque milieu

(TNI trop nombreux pour identifier)

2) Aspect des colonies, gélose dénombrement

- Colonies plates, couleur crème, contour irrégulier, d'aspect rugueux, qui s'étend sur toute la surface de la gélose formant une croissance confluente.

3) Aspect des colonies, gélose sang

- Colonies plates, couleur crème, contour irrégulier, d'aspect rugueux, formant une croissance confluente, hémolyse α.

4) Gram

- Bacilles Gram +, bacilles moyens, seul ou en chaînes de 3 à 4 bacilles, spore de forme cylindrique, en position subterminale.

5) Tests

Gram	:	+
Catalase	:	+
Motilité	:	+
Nitrate (réduction)	:	+
O-F glucose	:	F (fermentation)
Indole	:	-
Gélatine (liquéfaction 22°C)	:	+
Simmons citrate	:	-
Voges-Proskauer	:	-
Urée	:	+
Phénylalanine déaminase	:	-
Glucose	:	A (acidifie)
Mannitol	:	-
Arabinos	:	-
Xylose	:	-
7.5% NaCl	:	-
Amidon	:	+
Incubation 35h à 30°	:	Formation d'un crystal

Table II

Determination key of Bacillus thuringiensis *(AMC = acetyl-methyl-carbinol, ADH = arginine-dehydrolase, TW esterase = tween-esterase, c = weakly positive reaction)*

Biochemical characters							H-antigen	Variety
AMC + Lecithinase +	Salicin +	Proteolysis + TW esterase +	Sucrose + Pellicle + Urease −	Esculin + + +	ADH + Chitin − Mannose + Starch + +		1	*thuringiensis*
				Esculin + + ADH +	ADH Chitin + Mannose − Starch −		2	*finitimus*
					Chitin + Mannose − Starch +		13	*pakistani*
				Esculin + ADH +	Chitin + Mannose − Starch +		9	*tolworthi*
			Sucrose − Pellicle − Urease + ADH +	Esculin +	Chitin + + Mannose − Starch +		7	*alesti*
				Esculin +	Chitin − Mannose − Starch +		4a4c	*kenyae*
		Proteolysis + + ADH + Esculin + + +	Sucrose + Pellicle − TW esterase + Starch +	Urease + +	Chitin − Mannose +		12	*thompsoni*
				Urease −	Chitin + Mannose −		5a5c	*canadensis*
			Sucrose − Pellicle −	TW esterase + + Urease + +	Chitin + Mannose − Starch + +		3a3b	*kurstaki*
				TW esterase + Urease −	Chitin Mannose + Starch +		11a11c	*kyushuensis*
	Salicin −	Proteolysis + + ADH + Sucrose − Chitin −	Pellicle + Urease − TW esterase +	Esculin −	Mannose − Starch +		14	*israelensis*
			Pellicle − Urease + + TW esterase −	Esculin + + +	Mannose + Starch + +		11a11b	*toumanoffi*
		Proteolysis + + +	Pellicle − Urease − Esculin + Mannose − Starch +	ADH − TW esterase +	Chitin − Sucrose + Cellobiose −		4a4b	*sotto*
				ADH + TW esterase + +	Chitin + + Sucrose − Cellobiose +		4a4b	*dendrolimus*
					Chitin Sucrose − Cellobiose −		3a	*aizawai*
AMC + Lecithinase −	Salicin +	Proteolysis + ADH + Sucrose −	Pellicle − Urease +	Esculin + + + TW esterase −	Chitin + Mannose + Starch + +		5a5c	*galleriae*
			Pellicle + Urease −	Esculin − TW esterase +	Chitin − Mannose + Starch +		8a8c	*entomocidus*
		Proteolysis + + ADH + Sucrose +	Pellicle − Urease −	Esculin + TW esterase +	Chitin Mannose + Starch −		15	*indiana*
	Salicin −	Proteolysis + ADH	Sucrose + Pellicle + Urease −	Esculin + TW esterase + +	Chitin + Mannose − Starch +		8a8b	*morrisoni*
		Proteolysis + + ADH +	Sucrose − Pellicle − Urease −	Esculin + + TW esterase + +	Chitin Mannose − Starch + +		10	*darmstadiensis*
AMC − Lecithinase −	Salicin −	ADH Urease − Sucrose + Chitin −	Proteolysis + Pellicle +	Esculin + + TW esterase −	Mannose + Starch + +		6	*subtoxicus*
			Proteolysis + + Pellicle −	Esculin + TW esterase + +	Mannose + Starch +		6	*entomocidus*

BARJAC, H. de. (1981). Identification of H-serotypes of *Bacillus thuringiensis* in Microbial Control of pests and plant Diseases (1970-1980), Burges, H.D., ed. Academic Press, London and Toronto, pp. 35-43.

.../23

Annexe 5

Liste des échantillons envoyés au Dr H.W. Ackerman

Numéro des échantillons	Numéro du lot	Produit
1	41101	Thuricide 32 LV
2	41121	"
3	41121	"
4	41131	"
5	41091	"
6	41161	"
7	41151	"
8	41321	Thuricide 48 LV
9	41221	"
10	41331	"
11	41281	"
12	41291	"
13	41301	"
14	41311	"
15	T-15-1192	"
16	41261	"
17	S-1753	Futura
18	S-1756	"
19	45-134-BJ	Dipel 88
20	45-135-BJ	"
21	64-366-BJ	Dipel 132
22	41302	San 415
23	68-434-BJ	Dipel 176
24	41322	Thuricide 64 B
25	41322	"

.../24

Annexe 6

UNIVERSITÉ LAVAL
CITÉ UNIVERSITAIRE
QUÉBEC P.Q. CANADA
G1K 7P4

Ste-Foy, le 6 février 1985

Monsieur Jean Cabana
Ministère de l'Energie et Ressources
Unité d'Entomologie et de Pathologie
2700, Einstein
Local CRC 205
Ste-Foy, Qué. G1P 3W8

Cher Monsieur Cabana,

J'ai terminé l'étude de vos 25 souches de Bacillus thuringiensis et du phage P400. Avant de faire un rapport détaillé, j'aimerais vous informer brièvement des principaux résultats:

1- Toutes les 25 souches ébergent un ou plusieurs phages.

2- Vingt-cinq phages ont été isolés (1 par souche).

3- Vingt-quatre de ces phages et le P400 ont été examinés au microscope électronique (Philips 300) après coloration négative à l'acétate d'uranyle et au phosphotungstate. Le 25ième phage se propage mal et n'a pu être examiné.

4- Les phages appartiennent à 3 groupes morphologiques, correspondant à des espèces bien connues et isolées auparavant dans plusieurs pays dont le Canada:

   a) L'espèce SP50 (tête isométrique et queue contractile, P400 et 13 isolats),

   b) L'espèce "type 2" (tête allongée et queue longue et non contractile, 6 isolats),

   c) L'espèce GA-1 (tête allongée et queue courte, 6 isolats).

5- Tous les phages ont été essayés sur toutes les souches. D'après le spectre lytique, chaque groupe morphologique comprend deux variétés.

... /

.../25

6- Les souches appartiennent à six variétés différentes.

7- Il y a des corrélations intéressantes entre la phagosensibilité des souches, les phages qu'elles ébergent, et leur origine.

8- Une lysotypie de B. thuringiensis est possible et sans doute extrêmement intéressante à faire.

Vous aurez bientôt d'autres nouvelles de ma part.

Bien à vous,

H.-W. Ackermann, M.D.
Professeur
Département de Microbiologie
Faculté de Médecine

.../26

Annexe 7

UNIVERSITÉ LAVAL
CITÉ UNIVERSITAIRE
QUÉBEC P.Q. CANADA
G1K 7P4

Ste-Foy, le 15 octobre 1984

Monsieur Jean Cabana
Gouvernement du Québec
Ministère de l'Energie et des Ressources
Direction de la Conservation
Laboratoire de Microbiologie
575, Chemin Fraserville
Rivière-du-Loup, QC
G5R 3Y4

Cher Monsieur Cabana,

En réponse à votre appel téléphonique du 10 octobre et des questions que vous avez soulevées sur la présence de bactériophages dans les insecticides biologiques et produits alimentaires ainsi que leur influence sur l'être humain, je m'empresse de répondre:

1. Nature des bactériophages

Les bactériophages ou phages sont des virus de bactéries et cyanobactéries, donc d'organismes prokaryotes. Quelle que soit leur morphologie ou acide nucléique, ils se multiplient dans des prokaryotes seulement et aucune autre catégorie d'organismes. En particulier, ils ne se multiplient ni dans les plantes ni dans les animaux.

2. Incidence des phages

a. Des phages existent dans tout le règne bactérien, c'est-à-dire on en a trouvé chez toutes les bactéries où on a bien voulu les rechercher et qu'on est capable de cultiver. Actuellement, on connaît des phages chez une centaine de genres bactériens. Au moins 3,500 phages ont été examinés au microscope électronique.

b. Les phages existent partout où il y a des bactéries. On les a trouvés dans des habitats extrêmes (sources chaudes volcaniques et eau de mer de 825 m de profondeur). On en rencontre dans le sol, l'air, l'eau (surtout l'eau d'égout), les cavités naturelles et les déjections des animaux, les aliments, sur les plantes, des produits pathologiques ...

... /

.../27

c. Les phages et les bactéries co-existent dans un état d'équilibre, soit comme mélange de bactéries et de phages extracellulaires, soit comme système intégré. Dans ce cas, les phages sont latents à l'intérieur des bactéries et leur acide nucléique est intégré dans le génome bactérien. On parle alors de bactéries "lysogènes" et de phages "tempérés". Par contre, un phage "virulent" est incapable d'intégration.

3. Présence de phages dans les produits biologiques

a. Elle est parfaitement normale, à moins que le produit ait été stérilisé par chauffage. La simple filtration ne suffit pas. La présence de bactériophages dans des produits fabriqués à l'aide de bactéries n'a rien d'étonnant et est la règle.

b. On a trouvé des phages dans le lait, le petit lait, le yoghourt et des semences de fromages de toute sorte (gruyère, Emmenthal,...). On en a trouvé aussi dans le vin, la viande et des saucisses.

c. On rencontre des phages dans l'industrie des antibiotiques bactériens, c'est-à-dire produits par des bactéries.

d. On rencontre des phages dans l'industrie de fermentation (production d'alcohols, etc. par des bactéries).

e. Il serait normal de rencontrer des phages dans des insecticides biologiques comme le "thuricide". Il serait même étonnant qu'il n'y en ait pas.

f. Les phages dans un produit biologique proviennent soit
- soit d'un ensemencement, accidentel ou artificiel, d'un mélange de phages et de bactéries,
- soit de bactéries lysogènes, c'est-à-dire hébergeant des phages latents.

g. La présence de phages dans un produit biologique montre seulement que ce produit a été en contact avec des bactéries.

4. Rôle des phages dans les produits biologiques

a. Les phages peuvent servir d'indicateurs de contamination bactérienne, par exemple de contamination fécale des eaux de consommation.

b. Les phages peuvent être bénéfiques, par exemple en contrôlant la croissance explosive de cyanobactéries ("algal bloom") dans les eaux.

.. /

.../28

c. Les phages peuvent être néfastes en détruisant des bactéries utilisées dans la fabrication de fromages, d'antibiotiques ou d'alcohols ou acides organiques. Il est parfaitement concevable que les phages puissent détruire des préparations de Bacillus thuringiensis et interférer ainsi avec la production de "thuricide".

5. Influence des phages sur l'être humain

a. Il n'y a pas d'influence directe, puisque les phages sont incapables de se multiplier dans les cellules humaines.

b. Avant l'ère des antibiotiques, on a administré des phages à de nombreux malades, soit par ingestion ou instillation, inhalation ou injection par voie intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale ou intrathécale (dans le liquide céphalorachidien).

c. On n'a jamais observé une action pathogène des bactériophages, tout au plus des guérisons spectaculaires. Si la phagothérapie a été abandonnée chez l'homme (certains la pratiquent toujours), c'est à cause des antibiotiques.

d. Il y a une certaine influence indirecte:

i. La production de la toxine diphtérique et des toxines botuliniques est liée à la présence de phages latents dans les agents de la diphtérie et du botulisme.

ii. En administrant des phages d'entérobactéries par voie orale, on peut provoquer chez l'homme une perturbation de la flore intestinale et la libération d'endotoxines bactériennes (par destruction d'entérobactéries).

e. Il s'agit ici de deux cas bien spéciaux, ne présentant aucune contre-indication contre l'épandage de "thuricide".

i. Les phages, comme d'autres virus, sont plus ou moins spécifiques d'hôte. Un phage de Bacillus thuringiensis n'infectera jamais Corynebacterium diphteriae, Clostridium botulinum ou une entérobactérie.

ii. C. diphteriae et Cl. botulinum sont normalement porteuses de phages latents; l'infection est donc déjà "faite".

iii. B. thuringiensis et les bactéries apparentées, B. cereus, B. mycoides, B. Licheniformis ou B. anthracis, n'ont aucune action bénéfique pour l'homme, peuvent causer des intoxications alimentaires ou sont même très pathogènes (B. anthracis). La présence d'un phage contre ces bactéries serait donc tout au plus bénéfique.

Monsieur Jean Cabana
Le 15 octobre 1984

Je vous autorise à utiliser cette lettre comme il vous semblera approprié. Je suis à votre disposition pour des renseignements supplémentaires.

Bien à vous,

H.-W. Ackermann, M.D.
Professeur
Département de Microbiologie
Faculté de Médecine

Centre de Référence pour
Virus bactériens "Félix d'Hérelle"